

ATIVIDADE *IN VITRO* DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Rosmarinus officinalis* L. EM ISOLADOS CLÍNICOS DE FELINOS COM ESPOROTRICOSE

ANNA LUIZA SILVA¹; STEFANIE BRESSAN WALLER²; ISABEL MARTINS MADRID³; MARLETE BRUM CLEFF⁴; JOÃO ROBERTO BRAGA DE MELLO⁵; MÁRIO CARLOS ARAÚJO MEIRELES⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – annavet@live.com

²Universidade Federal do Rio Grande do Sul – waller.stefanie@yahoo.com.br

³Centro de Controle de Zoonoses de Pelotas – imadrid_rs@yahoo.com.br

⁴Universidade Federal de Pelotas – emebrium@bol.com.br

⁵Universidade Federal do Rio Grande do Sul – jmello@gabinete.ufrgs.br

⁶Universidade Federal de Pelotas – meireles@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma micose subcutânea que acomete o homem e diversas espécies de animais domésticos e silvestres (MEIRELES; NASCENTE, 2009). Esta doença é causada por fungos do Complexo *Sporothrix schenckii*, e se inicia com a inoculação traumática do fungo por feridas penetrantes na pele através do contato com solo, vegetal seco ou em decomposição contaminados, ou pela mordedura e arranhadura de algum animal infectado, principalmente os felinos (LARSSON, 2011).

Em zonas endêmicas, a esporotricose apresenta grande importância em saúde pública, devido ao seu potencial zoonótico e da evidência dos felinos na epidemiologia da enfermidade, e a proximidade cada vez maior desses animais com seus donos (FARIAS et al., 1997; TABOADA, 2004).

O tratamento da enfermidade consiste no uso de drogas antifúngicas, sendo o itraconazol considerado de eleição para caninos e felinos, e a dose recomendada para essas espécies de 10 a 40 mg/kg/dia, via oral, a cada 24h por cerca de três meses, devendo ser prolongado por no mínimo 30 dias após a cura clínica (MADRID et al., 2010). Porém, cepas resistentes a esta droga já foram comprovadas (MARIMON et al., 2008). Diante dessa problemática, outros fatores têm incentivado a busca por alternativas terapêuticas, como tempo prolongado e o alto custo dos medicamentos (SCHUBACH et al., 2004; MARIMON et al., 2008).

Dentre os condimentos da família *Lamiaceae*, está o alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), com atividade antimicrobiana comprovada na forma de óleo essencial contra os fungos patogênicos do gênero *Candida* spp., *Malassezia* spp. e *Trichosporon* spp. (SANTIN et al., 2010; GIORDANI et al., 2012). Entretanto, a atividade desta planta contra *Sporothrix* spp. ainda é escassa, havendo poucos estudos evidenciando sua atividade inibitória (LUQMAN et al., 2007).

Em vista disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade anti-*Sporothrix* spp. *in vitro* do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L., comparando sua eficácia com o itraconazol e avaliar os componentes químicos presentes.

2. METODOLOGIA

Os produtos foram adquiridos de distribuidores comerciais com certificação de registro, sendo Itraconazol (ITL® - Cepav Pharma Ltda., São Paulo, Brazil) testado nas concentrações de 64 a 0,12 µg/ml, ao passo que o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. (Ferquima® – Indústria e Comércio Ltda., Vargem Grande Paulista/SP, Brasil), obtido com certificação de origem da Tunísia, foi testado nas concentrações de 36 a 0,07 mg/ml. Utilizou-se a técnica de Microdiluição em Caldo

para os testes de suscetibilidade, conforme o documento M38-A3, preconizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), adaptado para o uso do fitofármaco. Os produtos foram testados contra 16 isolados fúngicos de *Sporothrix* spp. oriundos de casos clínicos de esporotricose felina e uma cepa padrão de *Sporothrix schenckii* (IOC 1226), precedidas pela Micoteca do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Micologia Veterinária (Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, UFPel, Pelotas, RS, Brasil). Os resultados foram expressos em Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM).

Para a análise dos constituintes químicos do óleo essencial, foi realizada cromatografia gasosa de alta resolução (CG-FID) em cromatógrafo a gás HP 7820A (Agilent) pelo Laboratório de Cromatografia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG, Belo Horizonte/MG, Brasil), sendo os dados adquiridos através de software EZChrom Elite Compact® (Agilent).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de suscetibilidade obtidos encontram-se na Tabela 1. Os isolados apresentaram atividade fungistática (CIM) variável de $\leq 0,07$ a 1,12 $\mu\text{g/ml}$, e atividade fungicida (CFM) de $\leq 0,07$ a 18 $\mu\text{g/ml}$, demonstrando que os valores da CFM em sua maioria foi superior aos valores da CIM. Os resultados mostraram que os isolados foram sensíveis ao óleo de *Rosmarinus officinalis* L., corroborando com estudos de LUQMAN et al. (2007), onde houve sensibilidade e a CIM de 11mg/ml.

A suscetibilidade dos isolados fúngicos ao itraconazol demonstrou variação na CIM entre $\leq 0,12$ a >64 $\mu\text{g/ml}$ e na CFM de 32 a >64 $\mu\text{g/ml}$, evidenciando uma possível resistência destes isolados ao antifúngico, o que já foi demonstrado por WALLER et al. (2013), cujos isolados de *Sporothrix* spp. foram em sua grande parte resistentes ao itraconazol testado. Em comparação ao óleo essencial de alecrim, nenhum isolado testado apresentou resistência às concentrações testadas.

Tabela 1. Atividade anti-*Sporothrix* spp. do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. (mg/ml) e do Itraconazol ($\mu\text{g/ml}$) expressos em valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) contra isolados clínicos oriundos da esporotricose felina.

ISOLADOS	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.		Itraconazol	
	CIM	CFM	CIM	CFM
Felino 1	0,56	9	2	>64
Felino 2	1,12	4,5	2	>64
Felino 3	0,28	2,25	2	>64
Felino 4	0,14	2,25	2	>64
Felino 5	1,12	2,25	>64	>64
Felino 6	0,14	2,25	2	>64
Felino 7	$\leq 0,07$	2,25	>64	>64
Felino 8	0,56	2,25	32	32
Felino 9	0,28	0,28	16	>64
Felino 10	$\leq 0,07$	4,5	16	>64
Felino 11	0,28	18	$\leq 0,12$	>64
Felino 12	0,28	1,12	0,25	>64
Felino 13	0,56	1,12	$\leq 0,12$	>64
Felino 14	0,56	0,56	$\leq 0,12$	>64

Felino 15	≤0,07	≤0,07	0,25	32
Felino 16	≤0,07	0,28	8	>64
IOC 1226	1,12	1,12	≤0,12	>64

A análise química identificou vinte componentes do óleo essencial de alecrim, sendo eles: α -thujeno (0.2%), α -pineno (12.2%), canfeno (1.1%), β -pineno (9.4%), mirceno (0.5%), α -felandreno (0.1%), α -terpineno (0.1%), p-cimeno (0.4%), limoneno (20%), 1,8-cineol (49.4%), γ -terpineno (0.1%), linalool (1.0%), cânfora (17.8%), terpinen-4-ol (0.2%), α -terpineol (0.5%), acetato de bornila (0.3%), α -copaeno (0.3%), β -cariofileno (3.7%), humuleno (0.2%), conforme a Figura 1.

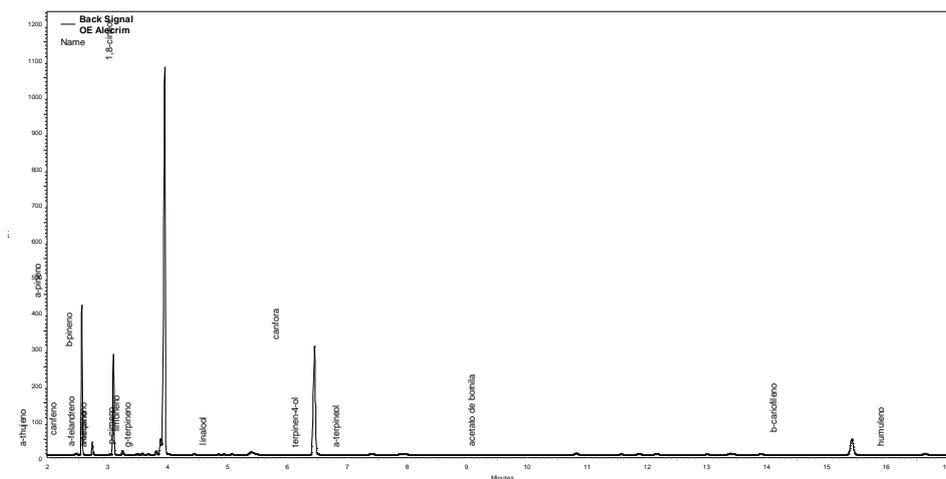


Figura 1. Constituintes químicos identificados no óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. por retenção de tempo em minutos através da cromatografia gasosa de alta resolução (CG-FID).

Dentro destes componentes, os principais foram 1,8-cineol, limoneno, cânfora, α -pineno e β -pineno, estando essas substâncias possivelmente relacionadas à atividade antifúngica, assim como demonstrado por GIORDANI et al. (2004), cujas substâncias citadas foram atribuídas à propriedade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim estudado. Outros trabalhos, como o de ANGIONI et al. (2004) citam α -pineno, borneol, canfeno, cânfora e verbenona como os principais componentes do óleo essencial de alecrim. E em seu estudo, FONSECA et al (1999) descreve com principais componentes a cânfora, verbenona, 1,8-cineol, mirceno, α -terpineol e borneol. A diferença na composição química está atribuída à sazonalidade e época de cultivo da planta, tipo de processamento, entre outros fatores (NASCIMENTO et al., 2007).

4. CONCLUSÕES

A atividade *in vitro* comparativa do itraconazol com o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. auxiliou no maior aprofundamento sobre a suscetibilidade e resistência de isolados clínicos do Complexo *Sporothrix* spp. Pode-se observar que a aplicação do óleo essencial de alecrim para o controle alternativo da esporotricose é promissor, devendo-se realizar maiores estudos em farmacologia e toxicidade para a segurança de seu uso.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGIONI, A. et al. Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. Journal Agricultural and Food Chemistry , v.52, p.3530-3535, 2004.

FARIAS, M. R. et al. Esporotricose canina e felina. Cães & Gatos. n. 76, p. 30-38, 1997

FONSECA, A. O. da S. et al. Avaliação preliminar do uso de óleo essencial de alecrim em dermatófitos isolados de animais. In: XI ENPOS, 1999, Pelotas/Brasil. Anais do XI ENPOS, 1999.

GIORDANI C, SANTIN R, CLEFF MB. Plantas medicinais e tóxicas em Pelotas, RS – usos e cuidados. Pelotas: Editora e Gráfica Universitária, 2012. 138p.

GIORDANI, R. et al. Antifungal effect of various essential oils against *Candida albicans*. Potentiation of antifungal action of amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. Phytotherapy Reserch , n.18, p.990-995, 2004

LARSSON, C.E. Esporotricose. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, 48 (3), 250-259, 2011.

LUQMAN, S.; DWIVEDI, G.R.; DAROKAR, M.P.; KALRA, A.; KHANUJA, S.P.S. Potential of Rosemary Oil to be used in Drug-Resistant Infections. Alternative Therapies, 13 (5), 54 – 59, 2007.

MADRID, I.M.; MATTEI, A.S.; MARTINS, A.F.; NOBRE, M.O.; MEIRELES, M.C.A. Feline Sporotrichosis in the Southern Region of Rio Grande do Sul, Brazil: Clinical, Zoonotic and Therapeutic Aspects. Zoonoses Public Health, 27, 151-154, 2010.

MARIMON, R.; SERENA, C.; GENÉ, J.; CANO, J.; GUARRO, J. *In Vitro* Antifungal Susceptibilities of Five Species of *Sporothrix*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 52 (2), 732-734, 2008.

MEIRELES, M.C.A.; NASCENTE, P. S.; Micologia Veterinária. Pelotas: UFPEL- Editora e Gráfica Universitária. 2009, p.109-123.

NASCIMENTO PFC, NASCIMENTO AC, RODRIGUES CS, ANTONIOLLI AA, SANTOS PO, BARBOSA JUNIOR AM, TRINDADE R.C 2007. Antimicrobial activity of the essentials oils: a multifactor approach of the methods. Rev Bras Farmacogn 17: 108- 11

SANTIN, R.; MADRID, I. M; MATTEI, A.S.; SILVA, F. V.; ALVES, G. H.; MEIRELES, M. C. A.; CLEFF, M. B.; MELLO, J. R. B. Potencial antifúngico do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* (alecrim). In: IX INFOCUS, 2010, Santiago/Chile. Anais do IX INFOCUS, 2010.

SCHUBACH, T.M.; SCHUBACH, A.; OKAMOTO, T.; BARROS, M.; FIGUEIREDO, F.B.; CUZZI, T.; FIALHO-MONTEIRO, P.C.; PEREZ, R.S.; WANKE, B. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998–2001). JAVMA, 224(10): 1623- 1629, 2004.

TABOADA, J. Micoses sistêmicas. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. Tratado de Medicina Interna Veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., v. 1, p. 478-503, 2004.

WALLER; S. B. et al. Eficácia *in vitro* de manipulações magistrais de itraconazol no tratamento da esporotricose felina e canina. In: XV ENPOS, Pelotas/ Brasil. Anais do XV ENPOS, 2013

AGRADECIMENTOS: Cnpq, Capes, Fapergs.